

氏 名	有川 健太郎
学 位 の 種 類	博士 (学術)
学 位 記 番 号	第 5670 号
学位授与年月日	平成 23 年 3 月 24 日
学位授与の要件	学位規則第 4 条第 2 項
学 位 論 文 名	非線毛性接着因子 (Afa) 遺伝子を保有する分散接着性大腸菌の下痢原性に関する疫学的・細菌学的研究 —腸粘膜上皮細胞に対する炎症性サイトカイン産生誘導とその機構に着目して—
論文審査委員	主 査 教 授 西川 禎一 副 査 教 授 曾根 良昭 副 査 教 授 羽生 大記 副 査 教 授 堀口 安彦 (大阪大学微生物病研究所)

論 文 内 容 の 要 旨

感染性下痢症は公衆衛生上の重要な問題であり、下痢原性大腸菌 (*Diarrheagenic Escherichia coli*; DEC) は主要な原因菌の一つである。DEC はその病原因子や病原機序により 6 種の群に分類されているが、その一つである分散接着性大腸菌 (DAEC) については病原機構や下痢原性について未だ明瞭な結論は得られていない。本研究では、DAEC 株は細胞付着性という性状のみによって識別分類されてきたために病原菌と非病原菌が混在し結論を困難にしていると考え、DAEC 群から病原性 DAEC 株のみを明確に区別する指標を探索した。近年、腸管感染症の発症要因として炎症性サイトカインの役割が着目されている。そこで本論文では、下痢原性 DAEC を適確に識別する指標として IL-8 産生誘導能に注目し、下痢患者および健康者から分離された DAEC について疫学的・細菌学的検討を加えた。

第 1 章では、下痢症患者から分離された Afa 陽性 DAEC 株に着目し、その定着因子や培養細胞へのサイトカイン誘導性を調べた。その結果、同様の分散接着像を呈しているにもかかわらず、IL-8 を誘導する株と誘導しない株が存在することが判明し、今まで分離されてきた DAEC は病原性株と非病原性株が混在する不均一な菌群であることを示した。すなわち、細胞への付着自体が直接 IL-8 誘導を引き起こしているわけではなく、別の IL-8 誘導因子が関与していることを示した。

第 2 章では、IL-8 誘導性と菌の運動性に高い相関があることを発見し、IL-8 誘導における菌のべん毛の役割とその誘導機序を検討した。その結果、DAEC のべん毛タンパクが上皮細胞にある Toll-like receptor (TLR) 5 によって認識されることで IL-8 が誘導されることを明らかにした。

第 3 章では健康者から分離された Afa 陽性 DAEC と下痢症患者由来株との比較を行なった。その結果、健康者由来の運動性を保有する 15 株のうち IL-8 を誘導したのは 2 株だけであった (2/15, 13%)。下痢症由来の運動性 DAEC 株が全て IL-8 誘導性を示したのに比べ、健康者由来の運動性 DAEC 株は IL-8 誘導性が明らかに低かった。しかしながら、細胞極性の無い HEp-2 細胞に対しては 15 株中 10 株 (67%) に IL-8 誘導性が認められたことから、健康者由来株は細胞間のタイトジャンクション (TJ) を弛緩させる能力が低いために細胞底部側にある TLR5 にべん毛タンパクが到達し難く IL-8 誘導が低いと推察している。

論 文 審 査 の 結 果 の 要 旨

下痢原性大腸菌 (*Diarrheagenic Escherichia coli*; DEC) は、その病原因子や病原機序により腸管病原性大腸菌、腸管毒素原性大腸菌、腸管組織侵入性大腸菌、腸管出血性大腸菌、腸管凝集接着性大腸菌、分散接着性大腸菌 (DAEC) の 6 種に分類されている。しかしながら、DAEC の病因学的意義については、明確な結論は得られていない。申請者は、DAEC には病原菌と非病原菌が混在するために結論が困難になっているとの仮説を立て、病原性 DAEC 株を不均一な DAEC 群から明確に区別する指標を明らかにすべく本研究を実施した。

第 1 章では、下痢患者から原因菌として分離された 19 株の非線毛性接着因子 (Afa) 保有 DAEC 株に着目し、その定着因子や培養細胞へのサイトカイン誘導性を調べている。その結果、

DAEC には IL-8 を誘導する株と誘導しない株があることを明らかにし、仮説を支持する結果を得ている。DAEC が病原性株と非病原性株からなる不均一な菌群であることを示唆する新規性の高い知見を得ており、発表の翌年には国際誌の総説でも引用されており評価できる。

第 2 章では、DAEC の起炎性と運動性の相関を示したうえで、IL-8 誘導における菌のべん毛の役割について検討している。その結果、IL-8 を誘導するには LIM 培地で確認できる程の強い運動性を有する必要があることを明らかにした。次いで、IL-8 誘導に関わる上皮細胞側の因子について検討し、自然免疫の分子機構として知られる Toll-like receptor (TLR) の一つである TLR5 がべん毛を認識し IL-8 を誘導していることを証明した。しかしながら、TLR5 は腸上皮細胞の基底側に局在する。申請者は、上皮細胞の頂部側に付着する DAEC のべん毛タンパクがどのように基底側に発現する TLR5 と応答するか調べ、DAEC が上皮細胞相互の結合を弛緩させ、べん毛タンパクが基底膜側に移動しやすくなっていると推察している。これは Afa と運動性に続く DAEC 第 3 の病原因子解明につながる重要な提案である。

第 3 章は、これまでに得た知見が下痢原性 DAEC 株を識別する指標たりうるか否か疫学的に検証しようとするものであり、健康者から分離した 17 株の Afa 陽性 DAEC 株について下痢症患者由来 DAEC 株との比較を行なっている。その多く (15/17, 88%) が LIM 培地を用いた運動性試験で陽性であったが、下痢症由来 DAEC 株と同程度の IL-8 を誘導したのは 2 株だけであった (2/15, 13%)。下痢症由来 DAEC 株の運動性と IL-8 誘導性が完全に相関していたのと比較すると、健康者由来の運動性 DAEC 株は IL-8 誘導性が明らかに低く、IL-8 誘導性をもって下痢原性の指標にしようとする申請者の仮説を疫学的に支持するものとなっている。

以上、DAEC の病原性は株により異なり、下痢症を起こす菌株を識別するには上皮細胞への分散接着とともに、べん毛タンパクによる TLR5 の活性化を介した炎症反応の誘導を確認する必要があることを示した。食品衛生の現場において見過ごされてきた DAEC だが、本研究結果は Afa 遺伝子の保有と運動性を調べる簡便な一次スクリーニング検査で下痢原性株を絞り込めることを示しており、食の安全確保に有用な知見を提供している。その研究内容と質に鑑みて、本審査委員会は本論文が博士（学術）の学位に値するものと認定した。